

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-076592
(43)Date of publication of application : 15.03.1990

(51)Int.Cl. C12P 7/56

(21)Application number : 01-184839 (71)Applicant : RHONE POULENC CHIM
(22)Date of filing : 19.07.1989 (72)Inventor : SCHNEIDER DIDIER
LAMONERIE HUBERT

(30)Priority

Priority number : 88 8810789 Priority date : 10.08.1988 Priority country : FR

(54) PRODUCTION OF LACTIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the hydrolysis of starch and at the same time the economical production of lactic acid by adding an amylose-hydrolyzing saccharifying enzyme into an aqueous nutrient medium containing starch as an assimilable carbon source and fermenting the mixture with microorganism.

CONSTITUTION: Drinking water is added to a starch such as wheat flour to prepare a suspension, and the suspension is liquefied by blowing steam into it. Subsequently, the resultant liquid is placed in a fermentation tank, and this is sterilized after adding a nitrogen source such as ammonium sulfate and other nutrients. Then, at least one of saccharifying enzymes such as glucoamylase is charged into the sterilized mixture to prepare a medium. Into the aqueous medium, a cultured body of *Lactobacillus lactis* ATCC 12314, which has been inoculated into a medium such as an MRS medium, is seeded, and the mixture is fermented to produce lactic acid. After the fermentation, the produced lactic acid is recovered from a fermentation tank, and it is purified by known methods such as filtration and solvent extraction. This process enables the production of lactic acid under the saving of time with the omission of a process, in which the starch is saccharified in advance, as well as at a low cost.

[特許]2004-042464

[受付日]平成20.09.10

1/E

【書類名】刊行物等提出書

【提出日】平成20年 9月 8日

【あて先】特許庁長官 鈴木 隆史 殿

【事件の表示】

【出願番号】特願2004- 42464

【出願公開番号】特開2004-248673

【提出者】

【住所又は居所】省略

【氏名又は名称】省略

【提出する刊行物等】刊行物 1 : 特開平2-76592号 (公開日 : 平成2 (1990) 年3月15日)

【提出の理由】

【提出物件の目録】

【物件名】刊行物 1 : 特開平2-76592号

写し 1

公知刊行物 / /

⑧日本国特許庁 (JP)

⑩特許出版公開

⑨公開特許公報 (A) 平2-76592

⑤Int. Cl.⁸
C 12 P 7/58識別記号
6926-4B

⑩公開 平成2年(1990)3月15日

審査請求 有 求求項の数 11 (全6頁)

④発明の名称 乳酸の製法

⑤特 願 平1-184839

【添付書類】

6 / 76

⑥出願 平1(1989)7月19日

⑦優先権主張 ⑧1988年8月10日⑨フランス(FR)⑩8810789

⑧発明者 ディディエ シュメダ フランス国, 79500-メル, リュ エロワ リカール, 7

⑨発明者 ウベール ラモースリ フランス国, 79500-メル, リュ フコードリー(番地なし)

⑩出願人 ローヌーブラン シミ フランス国, 92403-クールブボワ, ケ ポール ド ウメール, 25

⑪代理人 代理士 齊木 朗 外4名

明細書

1. 発明の名称

乳酸の製法

2. 特許請求の範囲

1. 實化可能な供養剤として殺菌を含む水性発酵培地中の微生物を使用する酵母による乳酸の製法であって、少なくとも1つのアミロース加水分解酵素を活性的に存在させて酵母を行うことを特徴とする方法。

2. 純粋を、純化したか、または部分的に純化した状態で使用する、請求項1記載の方法。

3. 純粋を生産前の状態で使用する、請求項1記載の方法。

4. 純粋培地が、種化酵素に加えて純化酵素を含む、請求項3記載の方法。

5. 純粋が、種培地に対するグルコーズの組成比が0.9~1.8%となるものに必要な量を含む、請求項1~4のいずれかに記載の方法。

6. 純化酵素を、ロアミラーゼ、betaミラーゼ、グルコアミラーゼ、インソミラーゼ、ブルラナーゼおよびこれらの混合物から選ぶ、請求項1~5のいずれかに記載の方法。

7. 純化酵素を、乾燥状態で測定した純度1%のいずれかに記載の方法。

8. 純化酵素を、乾燥状態で測定した純度1%に対して0.04~2摩ル濃度単位となる量に十分な量を使用する、請求項1~6のいずれかに記載の方法。

9. 純化酵素がグルコアミラーゼであり、かつ純粋に含まれる固体の量に対して0.02~1.0%である量を使用する、請求項1~7のいずれかに記載の方法。

10. 純度を0.3.0~8.0で行う、請求項1~9のいずれかに記載の方法。

11. pHを、アルカリ性、アルカリ土金属またはアンモニウムの水酸化物または炭酸塩から選ぶ添加剤によって制御する、請求項1~9記載の方法。

(1)

(2)

特開平2-76592(2)

法。

3. 発酵の詳細な説明

本発明は微生物によって脱水化合物を酵解させる乳酸製造の改良方法に関する。さらに、特許すれば微生物から由来する糖類の転化による微生物学的方法に関する。

通常は微生物を存在させて、糖類を酵解させる有機物の合成は世界的に熟知の方法である。このような微生物による糖類で書られる典型的な糖としては、たとえば澱粉、乳糖、ぐんぐん糖、グルコシル糖、2-ケトグルコシル糖、フマル酸、およびイタコン酸がある。これらの酸は食品、医薬品、化粧品およびその他の工業で使用される。その関連などとすればS. J. Gutcho-Moyes Data CorporationのChemicals by Fermentation, 1973に記載されている。

工業的規模において、益生の脱水化合物は、使用の容易さ、価格および効率を目的とする可能性を同時に考慮して選択する。酵母は、容易に得られる脱水化合物として、しばしば選択された。しかし、すべて

ての微生物は、大部分がデキストロースを代謝するのに、澱粉を代謝することができない。その結果、澱粉は酵母に加水分解して簡便化しなければならないので、製造原液を蓄めていた。

本発明の主要な目的は、栄養源として酵母を使用し、グルコースまたはグルコースを豊富な多い最初の加水分解生成物の代わりと少なくとも等しい程度で、経済的に簡便化する方法を提供することである。

微生物を使用して、澱粉を酵素的に加水分解すると同時に、酵解させた糖類を合成できることが発見した。これによって、酵母を手で簡便化する工程の省略による時間の短縮の他に、酵母活性の改善および活性が、加水分解生成物の表面活性条件と異っていても、糖の生成速度がグルコースを基質とする場合に比べて影響を受けないことは予想されることであった。

本発明による、発酵できる微生物として酵母を含む水性液体を培地を微生物によって酵解させる乳酸の製法は、少なくとも1つのアミロース加水分

(3)

(4)

酵解化酵素を加えて、酵解させる。

本発明によって供給菌として使用する酵母は、小麦、トウモロコシ、米、オーマイコカ、酵母、燕麦のような穀物の酵母、または馬鈴薯のよしなら、馬鈴薯の酵母ともい。酵母は生産物のままか、または液化したか、または特に基化した形で使用する。

本発明において、通常「酵母」は、生産物の水性酵母菌、酵母の不完全な加水分解生成物、たとえば液化化（液化化）した酵母、酵母のシロップ、およびデキストロースに富む加水分解生成物を中心とする。酵母の加水分解生成物は、加水分解の程度によって多様であり、この程度はデキストロース熱量、DE、およびオリガミックラライドおよび特に高級オリガミックラライドのデキストロース含量で表される。液化化酵母は、DE約3～20を示し、一般にオリガミックラライド30～35%を含み、酵母度がグリコース当量G/Tを示す。酵母のシロップ、またはデキストロース当量の低いグルコースのシロップは、DE、DEが約20～88を示し、G/Tを示す

ボリサッカライドが10～50%である。酵母の加水分解生成物またはデキストロースに富むシロップは、DEが90～95%に達する。酵母の加水分解生成物の酵母は、益生でよく知られている。益生化酵母および益生シロップは、液化のヨニアリゼー、特にヨニアリゼーによって液化加水分解およびまたは酵素加水分解によって得られる。

グルコースに富む加水分解生成物を得るには、2工程による酵母の液化、すなわち液化のヨニアリゼーの作用、次に酵解酵素たとえばアミログルコシダーゼの名でも知られているグルコアミナーゼの作用によることが多いともい。

本発明の方法の実施において、酵母シロップ、特に液化された酵母を使用することが好ましいグルコースに富む加水分解生成物の使用は、益生的見地から有利でない。それはアミログルコシダーゼの最適活性条件がG/Tで示される量度、およびDEも5～5においてと、英時間を要する酵素化工程を含むからである。

酵母およびその加水分解生成物は、精製しない

(5)

(6)

特開平 2-76592(3)

まま、滅菌した後に、本発明の方法に直接使用することができる。また複製され、濃縮または凝縮された市販の製品、たとえばマルトデキストリンも使用できる。

濃縮は、酵母培地中で、グルコース剤開拓培地の貢献比が約0.9～1.8%となるように存在させる。生酵母は、化粧品として、酵母培地に対して約16～200 g/m³、好みくは60～150 g/m³とする。

本発明によって、イタクリン酸生成微生物を含む酵母培地中に加える。アミロース分解酵素混合は、濃縮のデキストリンをグルコースおよびマルトースに実施することができる。醸化酵母として醸化ローミラーゼたとえば*Saccharomyces cerevisiae* var. *amylosaccharinum*、醸化アミラーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、ブルタナーゼを添加することができ、これらの酵素は脂肪または蛋白質で使用することができる。

グルコアミラーゼは特許が取っているので好みしい。グルコアミラーゼはすべての醸化グルコア

ミラーゼ、たとえば*Aspergillus*, *Endomyces*または*Rhizopus*とすることができます。酵素として特に生酵母を使用する場合は、醸化酵母、たとえば醸化ローミラーゼとアミラーゼ、または醸化ローミラーゼとグルコアミラーゼの混合物に加えて醸化酵母を使用することができます。酵素の工具的な製造方法は *Encycl. of Pol. Sc. Vol. 6, p46～53*に記載されている。

アミロース加水分解酵素混合、醸化酵母であってもよいが、これを酵母の醸化、または醸化に必要な量として酵母培地中に加える。最小使用量は酵素の活性度、培地中に存在する醸化の9.8%の割合であり、当業者によって要件に決定することができる。一般的には、乾燥状態で測定した醸化1 gに対して、酵素活性度0.04～2単位、好みくは0.1～1単位を用いるに十分な量を使用する。醸化酵母として *Novo Industry* が市販する商品名*ANG 200L*グルコアミラーゼは、酵母培地中に存在する醸化された醸化に含まれる固体の量にもとづいて、0.8～1%、好みくは0.95～

(7)

0.5%を加えることができる。

本発明の方法は、酵母の存在においてD-またはL-乳酸を生成できれば、どのような微生物でも使用することができます。特に *Lactobacillus*属たとえば*debrueckii*, *L. acidophilus*, *L. leichmanni*, *L. bulgaricus*, *L. jugorum*, *L. casei*, *L. italicus*, *L. plantarum*、および *Streptococcus*属たとえば*S. thermophilus*, *S. faecium*、および *Enterococcus*属たとえば*E. pentasaccharum*、ならびに*Sacillus*属、*Sporolactobacillus*属および其属たとえば*Rhizopus oryzae*を挙げることができる。

本発明で使用するアミロース分解酵素および醸造酵母の性、酵母培地中における濃度および文献の記載から選ぶことができる。适宜の製造培地はたとえば既刊 *Chemicals by Fermentation*の他、多くの特許たとえば米国特許A-3 25 494、フランス特許A-1 358 547、欧洲特許A-59 291、欧洲特許A-12 010、欧洲特許A-113 215、米国特許A-4 584 554に記載されている。

酵素は、醸化可能な糖類および有機化合物、

(8)

たとえば醸酸アンモニウム、醸化アンモニウム、リん酸アンモニウム、弱酸アンモニウム、トリエトロキシ(CSL)および/または大至の可能性掛出掛、尿素、ビール酵母、ペプトン、またなんばく分解生成物などおよびこれらの混合物を使用することができる。培地は、醸化強度たとえばCa, Mg, Na, K, Fe, Ni, Cu, Co, Mn, Znの酵素、醸化酵母、リん酸強度の他に、ビタミン、また他の酵素剤、たとえばpH調節剤および/または発泡防止剤を含むことができる。

微生物は、同様のように培養物または中間培養物として酵母培地中に導入する。

アミロース分解酵素は、後段前に滅菌した培地に加えることが好ましい。酵解は約5.0～8.0、好みくは5.0～7.0、温度約20～30℃として適宜行うが、適温条件は使用する微生物の特徴によって定める。*Lactobacillus lactis*を使用すると、pH 5.5～6.0、温度約35～45℃で乳酸の収率を上げることができる。酵素のpHを調節する中和剤は、アルカリ金属の水酸化物または

(9)

(10)

特開平2-76592(4)

脱脂粉、アルカリ土類金属のアシモニウムはから選び、操作の前、または脱脂の全工程において、選択的または不選択的に導入することができる。

同時にさせた後、生成した乳酸を荷物理から回収し、固知の方法、たとえば抽離、復元、結晶化、または高圧操作によって凝縮することができる。

下記の説明は、最初から由来する乳酸化物を含む培地に、脱脂またはその加水分解生成物であるモノまたはボリマーをライドを脱脂で分解することができる酵素を導入させて、微生物によって酵解させて、酵素を製造する特殊な方法を導入するものであるが、本発明の酵解培地の正確な組成または特殊な実験方法を規定するものではない。

次の実験例によって本発明を説明する。

例1

(a) 乳酸化された脱脂粉の組成

脱脂50 gの酵解液に、小糸繊物(ets ROUBETTE)6.75kgを導入した。脱脂水を導入しながら加えて全体積を20 Lの組成とした。脱脂液は8.50 LでpHを6.5に調整し、熱安定性アミラーゼ(臺味

濃度 TERHANTIL 120L-NHOV Industry)を含む組成物3.65 kgを加えた。30分間酵素を吸込んで温度100°Cで脱脂粉表面を液体化した後、周囲温度に冷却した。

(b) 脱脂

液体化した脱脂を古じる酵解液に、濃縮トウモロコシ(CSL)の液体水1.750 kg、魚たんぱく加水分解生成物0.270 kg、りん酸25 mgを導入した。混合液に脱脂水を加えて27 Lとした。この培養液を復元し、8408°C pHを5.0に調整し、1時間酵素を吸込んで100°Cで凝縮した。

付料の被覆層で、濃縮カルシウム4.2 kgを脱脂水13 Lまで熱融した。この被覆液に脱脂を1時間10分吸込んで被覆し、冷却した後、酵解液に被覆液状態で移した。温度を40°Cで酵解した。グルコアミラーゼ(生体酵素ABC 200L-NHOV Industry)を含む酵素濃度15.6 gを導入した。この培地に、手め落地IRS(Milieu de De Man, Rogosa et Sharpe-器械番号088-01)で817FCO)に接種したLactobacillus lactis ATCC 12314の増殖体1.7 Lを接種

(11)

(12)*

した。酵解培地は、基本的に50 gとし、40°Cの液温室内の空気内で復元し、被覆した。

酵解は45時間実験した。

D-乳酸123.3 gを導入、生産性は2.74 g/m²となりました。

比較例2~4

例1(b)に記載しように、同一のLactobacillus lactis ATCC 12314培養液を使用したが、グルコアミラーゼ不存在を除き、一連の結果を行った。供試菌は下記のように構成した。グルコアミラーゼと脱脂50 g(例2)、脱脂加水分解生成物9.150 kg(ets ROUBETTE市販の7498B)、乾燥状態の合脂70%、D.E.約96~97%(例3)、例1記載の条件で液体化した生産物6.75 kg(例4)。

各例において酵解培地の最終体積は50 gとした。酵解時間および生産性を第1表に示す。

各例1~4の工程において、酵解液の試料を定期的に採取して、高濃度ガスクロマトグラフィーによって乳酸の含量を測定した。その結果を第1表のグラフに示す。曲線1~4は、酵解培地中のg

まで液体化した乳酸の生産性Qと、酵解時間(h)で表わした熟成の度数として各例1~4について示す。

例5~6

下記条件が異なる点は、例1と同一の培養液を使用して例1と同一の条件で2つの酵解を行った。

例5 例6

グルコアミラーゼ	6.50 kg	7.25 kg
CaCO ₃	15.0 kg	16.7 kg
CaCO ₃	4.0 kg	4.5 kg

結果は第1表に示す。

(13)

(14)

特開平 2-76592(5)

第一表
D-乳酸

例	固形率		グルコース g/t	グルコース g/t	C S L g/t	焦たんぱく加水分解物 g/t	培養成剤	活性化 g/t	発酵時間 (h)	生産性 g/t/h
	グルコ ース g/t	酸性加水分解 物 g/t								
1			135	0.312	35	5.4	CaCO ₃	123.3	45	2.74
2	130				35	5.4	CaCO ₃	121	65	1.42
3		183			35	5.4	CaCO ₃	121.3	107	1.13
4			135		35	5.4	CaCO ₃	91.5	65	1.40
5			130	0.30	35	5.4	CaCO ₃	113	40	2.82
6			145	0.337	35	5.4	CaCO ₃	134.6	60	2.24

(1) グルコース含量 71%

(2) C S L=トキモロコシ液抽出液 (濃縮トキモロコシ液水)

(15)

例7 L+乳酸の貯蔵

例1記載の条件で液化したトキモロコシ液粉7kgを含む発酵槽に、液槽小部洗浄水 1.750kg、焦たんぱく加水分解物 0.270kg、りん酸25mlを加えた。この発酵槽を飲料水で27tに充填して液槽し、NaOHでpHを5.0に調整し、蒸気を1時間吹込んで滅菌した。

液槽カルシウム4.35kgを含む蒸留水前後16tを加え、温度を0℃で固種した。この培地にグルコアミラーゼ (登録番号AM-200L-HNOV Industry) を含む酵母液16.1mlを加え、予めM.R.S培地に液槽した。Lactobacillus casei IFO 3425液槽物1.7gを液槽した。

液槽培地は最初的に50tとして、40tの滅菌した滅菌蒸留水中で液槽し、液槽した。

L+乳酸の含菌は高速液体クロマトグラフィーで周期的に測定した。

液槽成廻り時間(h) 20 40 50 80 107
L+乳酸濃度(g/t) 21 47.5 66 98 120.2

例8-11

容器50tの発酵槽に酸性6kgを導入した。飲料水を投拌しながら加えて膨脹させ、全体积を27tとした。

酸性酵母液のpHをH₂SO₄で8.5に調整し、これで熱変性性α-アミラーゼ (登録番号TENMAN-120L-HNOV Industry) を含む酵素液13.25mlを液槽した。

液槽酵母液は次に、蒸気を30分吹込んで100℃で加熱して滅菌化した。

液槽した酵母液を液槽し、トキモロコシ液抽出液 1.750kg、焦たんぱく加水分解物 0.210kg、りん酸25mlを加えた。飲料水を加えて38tと液槽し、NaOHでpHを5.0に調整した。

導られた液槽に、蒸気を1時間吹込んで100℃で滅菌した。この工程の通りに、40tに液槽し、体积は83tであった。

この液槽に、グルコアミラーゼ (登録番号AM-200L-HNOV Industry) を含む酵素液13.2mlを加え、M.R.S培地中に適宜液槽したLactobacillus casei

(16)

(17)

特開平 2-76592(5)

[ATCC 12324の予備培養液 L.7.E を使用した。]

この調製液を複数種、滅菌した更生器滅菌器中で40℃で熱滅した。

培養液をとしてKH₂PO₄、NH₄OH、NaOHまたはKH₂PO₄を例8～11にそれぞれ加えてpHを自動的に6.0に調節した。

D-乳酸の含有量を差速凝集タコマットグラフィーによって測定して、次の結果を得た。

調製熱滅時間 (h)	25	50	75	85	90
D-乳酸濃度 (g/L)					
例8 (KH ₂ PO ₄)	39	76	88	101.8	102.3
例9 (NH ₄ OH)	35	71	91	92.5	94.5
例10 (NaOH)	30	68	87	89.9	
例11 (KH ₂ PO ₄)	31	71	88	93.3	

4. 図面の簡単な説明

第1図は例1～4における熱滅時間と乳酸濃度との関係を示すグラフである。

(18)

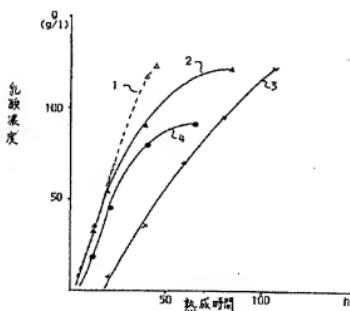


FIGURE 1